

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESEN (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. November 2003 (20.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/095635 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/00

WULLBRANDT, Dieter [DE/DE]; Am Söhlberg 15,
38321 Gross Denkte (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/01456

(74) Anwälte: EINSEL, Martin usw.; Jasperallee 1 a, 38102
Braunschweig (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Mai 2003 (06.05.2003)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 20 848.4 8. Mai 2002 (08.05.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH
[DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Straße, 52425 Jülich (DE).
INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE DER KOHLEN-
HYDRATE - ZUCKERINSTITUT - E.V. [DE/DE];
Langer Kamp 5, 38106 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SAHM, Hermann
[DE/DE]; Wendelinusstr. 71, 52428 Jülich (DE). HAHN,
Gerald [DE/DE]; Weberstrasse 18, 52134 Herzogen-
rath (DE). BRINGER-MEYER, Stephanie [DE/DE];
Josef-Rahier Strasse 13, 52428 Jülich (DE). KAUP,
Björn [DE/DE]; Rilkestrasse 7, 51067 Köln (DE).
HEMMERLING, Claudia [DE/DE]; Zum Ackerberg
37, 38126 Braunschweig (DE). WALTER, Martin
[DE/DE]; Glimmeshorn 17A, 38176 Bortfeld (DE).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, ein-
gereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschrei-
bung

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCE CODING FOR A MANNITOL 2-DEHYDROGENASE AND METHOD FOR THE PRO-
DUCTION OF D-MANNITOL

(54) Bezeichnung: FÜR EINE MANNITOL-2-DEHYDROGENASE CODIERENDE NUKLEOTIDSEQUENZ SOWIE
VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON D-MANNITOL

(57) Abstract: The invention relates to a nucleotide sequence coding for the mannitol 2-dehydrogenase and a method for producing
D-mannitol. Previously known biocatalytic methods for producing D-mannitol yield only small production rates due to the small
number of specific activities of mannitol 2-dehydrogenases used for transforming D-fructose into D-mannitol. D-mannitol produc-
tion can be improved by supplying a nucleotide sequence which codes for a mannitol 2-dehydrogenase having a higher specific
activity. Mannitol production can be increased in a particular manner by creating a regeneration system for reduction equivalents by
introducing and/or strengthening a formate dehydrogenase in a microorganism.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine für die Mannitol-2-Dehydrogenase codierende Nukleotidsequenz sowie ein
Verfahren zur Herstellung von D-Mannitol. Bisher bekannte biokatalytische Verfahren zur Herstellung von D-Mannitol weisen
nur geringe Produktionsraten auf Grund geringer spezifischer Aktivitäten der Mannitol-2-Dehydrogenasen für die Umsetzung von
D-Fructose zu D-Mannitol auf. Durch Bereitstellung einer Nukleotidsequenz, die für eine Mannitol-2-Dehydrogenase mit einer
höheren spezifischen Aktivität codiert, kann eine verbesserte D-Mannitolproduktion erreicht werden. Durch Schaffung eines Rege-
nerationssystems für Reduktionsäquivalente durch Einbringen und/oder Verstärken einer Formiatdehydrogenase in einen Mikroor-
ganismus, kann in besonderer Weise eine erhöhte Mannitol Produktion erreicht werden.

WO 03/095635 A2

Beschreibung

Für eine Mannitol-2-Dehydrogenase codierende Nukleotidsequenz sowie Verfahren zur Herstellung von D-Mannitol

Die Erfindung betrifft eine für die Mannitol-2-Dehydrogenase codierende Nukleotidsequenz sowie ein Verfahren zur Herstellung von D-Mannitol.

- 5 Der weltweite Jahresbedarf am Zuckeralkohol D-Mannitol (D-Mannit) beläuft sich auf 30.000 Tonnen im Jahr. D-Mannitol findet Verwendung im Lebensmittelbereich als zahnschonender Süßstoff, in der Medizin als Plasmaexpander und Vasodilator (Hexanitroderivat), sowie in der
10 pharmazeutischen Industrie zur Produktion von Tabletten.

- Die großtechnische Produktion von D-Mannitol erfolgt bisher über die katalytische Hydrierung an Metallkatalysatoren von Glucose/Fructose-Gemischen aus Saccharose
15 als Ausgangsmaterialien. Aufgrund der fehlenden Stereospezifität der katalytischen Hydrierung beträgt die Ausbeute an D-Mannitol nur 25-30% mit einem dreifachen Überschuß an D-Sorbitol (42, 21, 43).

- 20 D-Mannitol und D-Sorbitol unterscheiden sich nur durch ihre Konfiguration am Kohlenstoffatom C-2. Eine Alternative bietet die Herstellung von D-Mannitol durch enzymatische Hydrierung von D-Fructose in einem mikrobiellen Biotransformationsverfahren. Enzyme katalysieren
25 ihre Reaktionen stereospezifisch. Bei Slatner et al. (47) wird beispielsweise ein enzymatisches Verfahren beschrieben, bei dem eine rekombinante Mannitol-

Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* isoliert wird und zusammen mit einer Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* und NAD in einem Membranreaktor inkubiert wird. Durch den Einsatz der Formiat-Dehydrogenase wird ein Reduktions-Oxidationszyklus für NADH geschaffen, welches durch die Membran im Reaktionsgefäß zurückgehalten wird. Hier konnte 70-90% der Fructose in D-Mannitol umgewandelt werden. Von den Autoren wird jedoch die mangelnde Stabilität der Mannitol-Dehydrogenase (50 h Halbwertszeit; nach Stabilisierung mit Dithiothreitol: 100h), Empfindlichkeit gegenüber hohen Temperaturen >30°C sowie gegenüber Scherkräften, als ein Nachteil des Verfahrens angegeben. Ein weiterer großer Nachteil liegt jedoch darin, dass Membranreaktoren auf Grund der hohen Kosten für isolierte Enzyme, benötigte Cofaktoren und Membranen für eine großtechnische Produktion ungeeignet sind.

Eine weitere Möglichkeit der D-Mannitol Produktion kann durch fermentative Verfahren erfolgen. Bereits 1991 erzielten Soetaert et al. (36) durch fermentative D-Mannitol Herstellung Ausbeuten von 85% unter Einsatz von D-Fructose/D-Glucose-Gemischen als Substrate. Dabei verwendeten sie das heterofermentative Milchsäurebakterium *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 als katalysierenden Organismus in einer Fermentation mit wachsenden Zellen. Die für die Reduktion von Fructose zu D-Mannitol notwendigen Reduktionsäquivalente stammten hierbei aus der Oxidation von Glucose zu organischen Säuren (36). Neben dem Problem der nur 85%igen Umsetzung des Substrates Fructose zu D-Mannitol ist der Einsatz von D-Glucose als Elektronenlieferant kostenintensiv. Weiterhin stellt die Kontamination des Zielproduktes mit organischen Säuren während der Fermenta-

- tion einen weiteren Nachteil dar, da diese organischen Säuren durch aufwendige Prozeßschritte entfernt werden müssen. Soetaert et al. schlugen hierfür eine Elektrodialyse vor (36, 37). Bei Fermentationen mit wachsenden Zellen kann keine 100%ige Umsetzung des Substrates zum Produkt erzielt werden, da ein Teil des Substrates zum Zellaufbau bzw. zur Neubildung von Biomasse verbraucht wird.
- Das Schlüsselenzym für die enzymkatalysierte Reduktionsreaktion von D-Fructose zu D-Mannitol ist die Mannitol-2-Dehydrogenase. Aus der Literatur sind drei Mannitol-2-Dehydrogenasen bekannt und auch hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und Nukleotid-/Aminosäuresequenzen beschrieben. Hierzu gehört die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 (4, 34), aus *Rhodobacter sphaeroides* Si4 (32) sowie aus *Agaricus bisporus* (11, 38,). Die beiden Erstgenannten gehören zur Gruppe der langkettigen Dehydrogenase/Reduktase Protein Familie (LDR), die letztgenannte zur Gruppe der kurzkettigen Dehydrogenase/Reduktase Protein Familie (SDR). Die spezifische Aktivität dieser Enzyme bei der Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol liegt jedoch nur bei rund 40 bis 90 U/mg.
- Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein System zur Verfügung zu stellen, welches die zuvor genannten Nachteile nicht mehr aufweist sowie neue Maßnahmen zur verbesserten mikrobiellen Herstellung von D-Mannitol bereitzustellen.

Unter der Bezeichnung D- Mannitol soll im folgenden auch D-Mannit verstanden werden.

Im Rahmen dieser Erfindung werden im Folgenden alle Nukleotidsequenzen, die für eine Mannitol-2-Dehydrogenase codieren unter der Bezeichnung "mdh-Gensequenz" zusammengefasst. Das Enzym Mannitol-2-Dehydrogenase
5 wird im Folgenden unter der Bezeichnung „MDH“ zusammengefasst.

Es ist Aufgabe der Erfindung eine Nukleotidsequenz kodierend für eine MDH bereitzustellen, enthaltend

- 10 i) eine Nukleotidsequenz, dargestellt in SEQ ID No. 1, oder
- ii) mindestens eine Nukleotidsequenz umfasst, die der Nukleotidsequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes ent-
15 spricht; oder
- iii) mindestens eine Nukleotidsequenz umfasst, die mit einer zur Nukleotidsequenz (i) oder (ii) komplementären Nukleotidsequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- 20 iiii) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i) umfasst. Dabei bedeutet der Begriff funktionsneutrale Sinnmutationen den Austausch chemisch ähnlicher Aminosäuren, wie z. B. Glycin durch Alanin oder Serin durch Threonin.

25

Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus der Familie der Lactobacteriaceae, bevorzugt der Gattung Leuconostoc besonders bevorzugt aus Leuconostoc pseudomesenteroides, ganz be-

sonders bevorzugt aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 isoliert werden.

Bei der DSMZ wurde gemäß den Bedingungen des Budapester
5 Vertrages die erfindungsgemäße *mdh*-Gensequenz am
20.02.2002 als Plasmid-DNA (pQE80L*mdh*) unter folgendem
Aktenzeichen hinterlegt: DSM 14824

Unter einer Nukleotidsequenz, einer Nukleinsäure oder
10 einem Nukleinsäurefragment ist erfindungsgemäß ein Po-
lymer aus RNA oder DNA zu verstehen, das einzel- oder
doppelsträngig sein kann und optional natürliche, che-
misch synthetisierte, modifizierte oder artifizielle
Nukleotide enthalten kann. Der Begriff DNA-Polymer
15 schließt hierbei auch genomische DNA, cDNA oder Mi-
schungen davon ein.

Erfindungsgemäß sind auch die den kodierenden Bereichen
(Strukturgenen) vorausgehenden (5'-oder upstream)
20 und/oder nachfolgenden (3'-oder downstream) Sequenzbe-
reiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Se-
quenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen.
Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder
das RNA Processing sowie die Translation beeinflussen.
25 Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u. a. Pro-
motoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren oder Trans-
lationsverstärker.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Genstruktur,
30 enthaltend wenigstens eine der zuvor beschriebenen
Nukleotidsequenzen codierend für eine MDH sowie mit
diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen,
welche die Expression der codierenden Sequenzen in der

Wirtszelle steuern. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung beispielsweise von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulatorischer Elemente derart, dass jedes
5 der regulatorischen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispielhaft sei hier ein durch IPTG (Isopropyl- β -thiogalactosid) induzierbarer Promotor genannt.

10

Die Herstellung einer Genstruktur erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken wie beispielsweise in
15 (24) beschrieben.

20

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen Vektor enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz der zuvor beschriebenen Art kodierend für eine MDH, mit diesen operativ verknüpfte regulative Nukleotidsequenzen sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion transformierter Wirtszellen, für die Replikation innerhalb der Wirtszelle oder zur Integration in das entsprechende Wirtszell-Genom. Ferner kann der erfindungsgemäße Vektor eine Genstruktur der vorgenannten Art
25 enthalten.

Als Vektoren eignen sich solche, die in den Wirtszellen repliziert werden

30

Unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen können entsprechende Sonden oder auch Primer synthetisiert und dazu verwendet werden, beispielsweise mit Hilfe der PCR-Technik analoge Gene aus anderen

Mikroorganismen, bevorzugt aus der Gattung *Leuconostoc* zu amplifizieren und isolieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch
5 eine Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, kodierend für an der Biosynthese von D-Mannitol beteiligte Proteine, wobei diese Sonde ausgehend von den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen der zuvor be-
10 schriebenen Art hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält. Bei der Sonde kann es sich um einen Teilausschnitt der erfindungsgemäßen Sequenz, beispielsweise aus einem konservierten Bereich handeln der unter stringenten Bedingungen spezifisch mit homologen Nukleotidsequenzen hybridisieren kann.
15 Geeignete Markierungen sind aus der Literatur zahlreich bekannt. Anleitungen hierzu findet der Fachmann beispielsweise in folgenden Literaturstellen (8, 18, 28).

Es ist Aufgabe der Erfindung eine MDH, kodiert durch
20 eine erfindungsgemäße Nukleotidsequenz, gemäß SEQ ID No 1 oder deren Variationen der zuvor beschriebenen Art, mit einer gegenüber bisher bekannten MDHs verbesserten Aktivität in der Fructose-Reduktion bereitzustellen. Diese Aktivität wird in der vorliegenden Erfindung pho-
25 tometrisch über die Abnahme der NADH-Konzentration für die Reduktionsreaktion: $\text{D-Fructose} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{D-Mannitol} + \text{NAD}^+$ bestimmt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso eine MDH mit
30 einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Sequenz gemäß SEQ ID No 2 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon oder Mischungen daraus.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus der Familie der Lactobacteriaceae, bevorzugt aus der Gattung Leuconostoc, besonders bevorzugt der Art Leuconostoc pseudomesenteroides, ganz besonders bevorzugt aus Leuconostoc pseudomesenteroides ATCC 12291, stammen.

Unter Isoformen sind Enzyme mit gleicher oder vergleichbarer Substrat- und Wirkungsspezifität zu verstehen, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.

Unter modifizierten Formen sind erfindungsgemäß Enzyme zu verstehen, bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am N- und/oder C-Terminus des Polypeptids oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion des Enzyms zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen können in Form von Aminosäureaustauschen nach bekannten Methoden vorgenommen werden.

Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung, Mikroorganismen, enthaltend in replizierbarer Form wenigstens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure der zuvor beschriebenen Art, welche im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus verstärkt exprimiert wird und/oder deren Kopienzahl erhöht ist, bereitzustellen. Ebenso umfasst die vorliegende Erfindung einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur oder einen Vektor der zuvor beschriebenen Art. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist darüber hinaus, ein genetisch veränderter Mikroorganismus enthaltend wenigstens ein er-

findungsgemäßes Polypeptid mit der Funktion einer MDH der zuvor beschriebenen Art, welche eine im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöhte Aktivität aufweist. Die erfindungsgemäßen Mikroorganismen können aus der Gattung *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, den *Enterobacteriaceae* oder methyilotrophen Hefen, Pilzen sowie aus allen auch in der Lebensmittelindustrie verwendeten Mikroorganismen stammen. Beispielfhaft seien folgende geeignete Mikroorganismen genannt: *Achromobacter parvulus*, *Methylobacterium organophilum*, *Mycobacterium formicum*, *Pseudomonas spec. 101*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Moraxella sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Paracoccus sp.*, *Ancylobacter aquaticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Gluconobacter oxydans*, *Candida boidinii*, *Candida methylica* oder auch *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus nidulans* oder *Neurospora crassa* oder *Escherichia coli*.

Es besteht weiterhin die Aufgabe ein Verfahren zur Produktion von D-Mannitol zu schaffen, mit dem verbesserte Ausbeuten und höhere Produktivitäten erzielt werden können. Dies umfaßt sowohl das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen oder eines Teils davon, kodierend für eine MDH, ein Allel, Homolog oder Derivat davon in ein Wirtssystem als auch die Verstärkung einer bereits in einem Mikroorganismus vorhandenen Nukleotidsequenz codierend für eine MDH, wobei die Genexpression und/oder die Aktivität des entsprechend kodierten Polypeptids gegenüber dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöht ist, dieser genetisch veränderte Mikroorganismus zur mikrobiellen Herstellung

von D-Mannitol eingesetzt wird und das entsprechend gebildete D-Mannitol aus dem Kulturmedium und/oder den Zellen isoliert wird.

Das Einbringen der Nukleotidsequenz in eine Wirtszelle erfolgt nach gentechnischen Methoden. Als bevorzugtes
5 Verfahren sei hier die Transformation und besonders bevorzugt die Übertragung von DNA durch Elektroporation genannt.

Zur Erzielung einer Verstärkung der *mdh*-Gensequenz bzw.
10 einer erhöhten Genexpression (Überexpression) kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden. Ferner kann die Promotor- und/oder Regulationsregion und/oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, entsprechend so
15 verändert werden, daß die Expression mit erhöhter Rate erfolgt. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der mikrobiellen D-Mannitol
20 Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert
25 sein. Weiterhin kann auch die Aktivität des Enzyms selbst erhöht sein oder durch die Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins verstärkt werden. Alternativ kann ferner eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.
30

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (25), bei Guerrero et al. (9), Tsuchiya und Morinaga (41), bei Eikmanns et al. (7), bei

Schwarzer und Pühler (33), bei Reinscheid et al. (27), bei LaBarre et al. (16), bei Malumbres et al. (23), bei Jensen und Hammer (13), bei Makrides (22) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

5

Unter einem Wirtssystem sind Mikroorganismen zu verstehen, die alle mit fremder DNA transformierbar sind. Erfindungsgemäß sind hierunter Mikroorganismen zu verstehen, in die die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz eingebracht wird und/oder verstärkt wird und entsprechend zur Ausprägung gebracht wird. Mikroorganismen, die bereits eine für eine MDH codierende Nukleotidsequenz oder die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz aufweisen, wie z. B. *Leuconostoc pseudomesenteroides*, sind daher ebenfalls als Wirtssystem zu verstehen. Stellvertretend für ein geeignetes Wirtssystem, in das die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz eingebracht wird, sei das Bakterium *Escherichia coli* und bevorzugt der Stamm *E. coli* JM109(DE3) genannt, welcher unter Standardbedingungen kultiviert werden kann.

Als Kulturmedium ist je nach Anforderungen ein Komplexmedium wie z. B. LB-Medium (24) oder auch ein Mineralsalzmedium (15) geeignet. Nach entsprechender Kultivierung kann die Bakteriensuspension geerntet und zur weiteren Untersuchung, beispielsweise zur Transformation oder zur Isolierung von Nukleinsäuren nach gängigen Methoden eingesetzt werden.

Diese Vorgehensweise kann analog auch auf andere Bakterienstämme angewendet werden. Dabei werden als Wirtssysteme Bakterien der Gattungen *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, oder *Enterobacteriaceae* und methylorophe Hefe bevorzugt. Im folgenden werden beispielhaft einige bevorzugte Mikroorganismen aufgelistet: *Achromobacter*

parvolus, Methylobacterium organophilum, Mycobacterium
formicum, Pseudomonas spec. 101, Pseudomonas oxalati-
cus, Moraxella sp., Agrobacterium sp., Paracoccus sp.,
Ancylobacter aquaticus oder auch Pseudomonas fluores-
5 cens, Rhodobacter sphaeroides, Rhodobacter capsulatus,
Lactobacillus sp., Lactobacillus brevis, Leuconostoc
pseudomesenteroides, Gluconobacter oxydans oder methy-
lotrophe Hefen wie Candida boidinii, Candida methyllica
oder auch Hansenula polymorpha, Pilze wie Aspergillus
10 nidulans und Neurospora crassa sowie alle auch in der
Lebensmittelindustrie verwendeten Mikroorganismen. Dar-
über hinaus schließt die vorliegende Erfindung auch
Bakterienstämme ein, die sich als D-Mannitol produzie-
rende Mutanten oder Produktionsstämme auszeichnen. Die-
15 se können z. B. ausgehend von Wildtypstämmen durch
klassische (chemische oder physikalische) oder gentech-
nische Methoden hergestellt werden.

Die erfindungsgemäß hergestellten genetisch veränderten
20 Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinu-
ierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im
fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch
Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der
Produktion von D-Mannitol kultiviert werden. Eine Zu-
25 sammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind
im Lehrbuch von Chmiel (5) oder im Lehrbuch von Storhas
(39) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise
30 den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschrei-
bungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen
sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacte-
riology" (1) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können

Zucker und Kohlenhydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzu gegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden. In der vorliegenden Erfindung hat sich insbesondere der Zusatz von Zn^{2+} zum Medium als vorteilhaft erwiesen, da die Zellen besser mit dem für die MDH essentiellen Metallion versorgt werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Anti-

schaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe
5 Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 40°C und vorzugsweise bei 30 °C bis 37 °C. Die Kultur wird solange fortgesetzt
10 bis sich ein Maximum an D- Mannitol gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 12 Stunden bis 50 Stunden erreicht.

Die Analyse der D-Mannitol-Konzentration kann enzymatisch/photometrisch nach der Methode von K. Horikoshi
15 (12), oder durch Hochdruck-Flüssigkeits Chromatographie (HPLC) erfolgen so wie bei Lindroth et al. (19) beschrieben.

20 In einer vorteilhaften Ausführung des Verfahrens wird eine erhebliche Steigerung der Ausbeute bzw. der Umsatzrate des Substrates in Mannitol durch Schaffung eines Cofaktor-Regenerationssystems ermöglicht. Dabei wird nicht mehr das Substrat für die Bereitstellung der
25 für die Reduktion von Fructose zu Mannitol notwendigen Reduktionsäquivalente verbraucht, sondern durch ein zweites Enzymsystem bereitgestellt. Folglich steht das Substrat in erhöhtem Maße für die Umsetzung zu Mannitol zur Verfügung. Eines der am häufigsten eingesetzten
30 Systeme ist die Regenerierung mit einer Formiatdehydrogenase, z. B. aus *Candida boidinii* (46). Durch die Überexpression dieses Enzyms, zusammen mit einer beliebigen MDH, bevorzugt aus *Leuconostoc pseudomesenteroi-*

des oder auch aus *Rhodobacter sphaeroides*, im Mikroorganismus, wird ein Oxidations-Reduktionszyklus geschaffen. Die Expression der Enzyme kann in den für den jeweiligen Wirtsorganismus geeigneten Vektorsystemen erfolgen. In dem so geschaffenen Oxidations-Reduktionszyklus fungiert Formiat als Elektronendonator und D-Fructose als Elektronenakzeptor. Dabei katalysiert das Enzym Formiat-Dehydrogenase die Oxidation von Formiat zu CO_2 und das Enzym MDH die Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol (s. Fig. 1). Der intrazelluläre Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NAD)-Pool dient als Elektronen-Shuttle zwischen beiden Enzymen. Die Oxidation von Formiat zu CO_2 ist thermodynamisch günstig, da die freie Standardbildungsenergie ΔG^0 für CO_2 deutlich negativ ist und das CO_2 durch Ausgasen aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird. Die erhöhte intrazelluläre NADH-Konzentration, resultierend aus der Formiatoxidation, steigert die Reduktionskraft für die Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol, katalysiert durch MDH. In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens wird neben den bereits genannten Kohlenstoffquellen als Substrat für die mikrobielle Herstellung D-Glucose eingesetzt. D-Glucose kann durch intrazelluläre Umwandlung mit dem Enzym D-Glucose /Xylose-Isomerase (EC 5.3.1.5) zu D-Fructose umgewandelt werden (2). Eine extrazelluläre Umwandlung ist ebenfalls möglich, wobei die intrazelluläre jedoch bevorzugt ist. Der Einsatz von D-Glucose als Substrat in einem mikrobiellen Verfahren zur Produktion von D-Mannitol bewirkt eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Verfahrens, da die Kosten für D-Glucose nur etwa ein Viertel des Preises für D-Fructose betragen.

Für das beschriebene Verfahren eignen sich nicht nur Mikroorganismen, in die eine Formiatdehydrogenase und eine MDH eingebracht und/oder verstärkt wird, sondern auch Mikroorganismen, die bereits über eine Formiatdehydrogenase verfügen, wie z. B. *Achromobacter parvolus*, *Methylobacterium organophilum*, *Mycobacterium formicum*, *Pseudomonas spec. 101*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Moraxella* sp., *Agrobacterium* sp., *Paracoccus* sp., *Ancylobacter aquaticus*, oder auch über eine MDH verfügen. Dazu gehören Mikroorganismen wie z.B. *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus brevis*, *Gluconobacter oxydans* sowie bevorzugt auch *Leuconostoc pseudomesenteroides* oder Mikroorganismen, die bereits über beide Enzyme verfügen und jeweils in ihrer Aktivität verstärkt werden. Weiterhin geeignet sind beispielsweise auch methylo-trophe Hefen wie *Candida boidinii*, *Candida methylica* oder auch *Hansenula polymorpha*, Pilze wie *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* sowie alle auch in der Lebensmittelindustrie verwendeten Mikroorganismen.

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 4 erfindungsgemäß gelöst mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 4 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird weiterhin ausgehend von den Oberbegriffen der Ansprüche 5, 6, 7, 8, 9, 12, 17 und 20 erfindungsgemäß gelöst mit den im kennzeichnenden Teil der Ansprüche 5, 6, 7, 8, 9, 12, 17 und 20 angegebenen Merkmalen.

Mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure und dem Verfahren ist es nunmehr möglich, eine verbesserte Umsetzung des Substrates in das Produkt D-Mannitol zu erreichen. Es wird gegenüber bisher bekannten Verfahren eine erhöhte Produktivität, insbesondere durch die Verstärkung der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz, sowie eine erhöhte Ausbeute an D-Mannitol erreicht. So wird eine großtechnisch rentable Herstellung von D-Mannitol ermöglicht. Durch die Schaffung des Regenerationssystems mit Hilfe der Formiat Dehydrogenase kann für die NADH verbrauchende MDH in erhöhtem Maße ohne eine nachteilige Bildung von stoffwechselbedingten Nebenprodukten mit ruhenden Zellen eine erhöhte Umsetzung des Substrates in das Produkt D-Mannitol ermöglicht werden. Da Formiat als Elektronendonator weitaus billiger ist als Glucose, ergibt sich für das erfindungsgemäße Verfahren eine vorteilhafte Kostensenkung.

Weitere vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Die Zeichnungen zeigen beispielhaft Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie eine schematische Darstellung der wichtigsten Stoffwechselwege, die für das Verfahren eine Rolle spielen.

Es zeigt:

Fig. 1: Oxidoreduktionszyklus mit Formiat-Dehydrogenase und MDH

Fig. 2: Ableitung einer degenerierten 24 Basen-Oligonukleotid-Sonde von der N-terminalen Amino-

säuresequenz der MDH Untereinheit von *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291.

Fig. 3: Genkarte des 4,191 bp Eco RI Fragments isoliert aus der genomischen DNA-Plasmidbank von *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 nach Immuno-Screening des *mdh*-Gens. Die Pfeile zeigen die Richtung der Translation des *mdh* ORF sowie 4 ORFs an.

Im folgenden soll die Erfindung beispielhaft beschrieben werden.

Ausführungsbesipiele:

I) Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: Reinigung und Charakterisierung des Enzyms; Klonierung und funktionelle Expression des *mdh*-Gens in *Escherichia coli*

a) Bakterienstämme und Plasmide

Als Quelle für die Isolierung der MDH wurde *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 eingesetzt. *E. coli* JM 109 (DE 3) (Promega) diente als Wirtsorganismus zur Herstellung einer Plasmidbank für die Isolierung der genomischen DNA aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291. Ein Teil der Plasmidbank wurde durch Ligation eines 4.0 - 4.5 kb Eco RI Fragments genomischer DNA aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 in pUC18 hergestellt.

b) Kultivierungsbedingungen

Zur Kultivierung von *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 wurde folgendes Kultivierungsmedium verwendet:

- 5 Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 10 g/l, K_2HPO_4 10 g/l, D-Fructose 20 g/l, D-Glucose 10 g/l, Vitamin / Mineral-Lösung 10 ml/l, in destilliertem Wasser; pH-Wert auf 7,5 unter Verwendung von Ortho-Phosphorsäure.

- 10 Zur Subklonierung und Präparation der Plasmidbank der genomischen *Leuconostoc* DNA, wurde *E. coli* JM109 (DE 3) mit 170 Upm bei 37°C in Luria-Bertani Medium unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) oder Carbenicillin (50 µg/ml) kultiviert.

- 15 c) Bestimmung der Aktivität von MDH aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291

Die Enzymaktivität wird in der vorliegenden Erfindung photometrisch über die Abnahme der NADH-Konzentration für die Reduktionsreaktion

- 20 $D\text{-Fructose} + NADH + H^+ \rightarrow D\text{-Mannitol} + NAD^+$

- bestimmt. Der Ansatz zur Messung der Aktivität der MDH enthielt 200 µM NADH und 200 mM D-Fructose in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer bei pH 6,5. Die spezifischen Aktivitäten der Rohextrakte und der partiell gereinigten Enzymisolate werden als Units pro Milligramm Protein
25 (U/mg) angegeben, wobei 1 U als 1 µmol Substratabnahme pro Minute definiert wird (20).

d) Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Alle Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden nach der Methode von Bradford (3) durchgeführt.

5 e) Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese

Reinheitsanalysen von Rohextrakten und partiell gereinigten Enzymisolaten, sowie Präparationen vorbereitend auf Western-Blots wurden elektrophoretisch in diskontinuierlichen 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt nach der Methode von Lämmli (17).

f) Isolierung der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291

15 Zur Isolierung der Mannitol-2-Dehydrogenase wurde nach einem dem Fachmann bekannten Zellaufschluß (20) folgende Verfahrensschritte durchgeführt: Ammoniumsulfat-Präzipitation, Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), Anionentauscherchromatographie I (IEC I), Anionentauscherchromatographie II (IEC II), Größenausschlusschromatographie (SEC), sowie ein Chromatofocusing pH 5 - 4. Diese Methoden sind dem Fachmann allgemein bekannt und können beispielsweise aus (20) entnommen werden.

25 Die spezifische Aktivität der MDH betrug bei pH = 5,35 für die Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol 450 U/mg

Proben der Reinigungsschritte wurden zur Analyse einer SDS-PAGE unterzogen. Es zeigte sich eine homogene Bande bei 43 kDa nach dem letzten Schritt.

g) Charakterisierung der Mannitol-2-Dehydrogenase aus
Leuconostoc pseudomesenteroides ATCC 12291

Das native Molekulargewicht der MDH wurde durch Size
Exclusion Chromatographie zu 177 kDa bestimmt. Der isoe-
lektrische Punkt des Enzyms ist bei pH 4,3-4,4. Diese
Bestimmungen wurden nach dem Fachmann allgemein bekann-
ten Methoden durchgeführt und können beispielsweise aus
Lottspeich und Zorbas (20) entnommen werden.

Die Ergebnisse hinsichtlich des Molekulargewichts des
nativen und des dissoziierten Enzyms lassen darauf
schließen, dass die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *L.*
pseudomesenteroides ATCC 12291 ein homotetrameres Enzym
ist.

h) Molekulargenetische Methoden

Die Isolierung von genomischer DNA aus *Leuconostoc*
pseudomesenteroides ATCC 12291, die Isolierung von DNA-
Fragmenten aus Agarosegelen, die Markierung von DNA-
Sonden mit Digoxigenin modifiziertem dUTP und immunolo-
gische Detektion und DNA-DNA-Hybridisierung (Southern
Blot) wurden nach dem Fachmann geläufigen Methoden
durchgeführt (24).

Die aminoterminalen Aminosäuresequenzierung der 43 kDa-Enzym-
untereinheit mittels Edman-Abbau und anschließender
HPLC-Analyse ergab die oktamere Aminosäureabfolge
MEALVLTG. Unter Verwendung einer Codon usage-Statistik
für *Leuconostoc pseudomesenteroides* (14), wurde eine
2048fach degenerierte Oligonukleotid-Sonde zur Detekti-
on des Mannitol-2-Dehydrogenase-Gens an genomischer DNA
von *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 abgelei-
tet (siehe Fig. 2). Die 24 bp-DNA-Sonde wurde mit einem

Digoxigenin-11-dUTP-Schwanz am 3'-Ende versehen und diente zum Immuno-Screening von partiellen Plasmidbanken genomischer DNA von *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291. Auf diesem Wege wurde ein 4,2 kb-DNA-Fragment
5 isoliert (Fig. 3). Mit geeigneten Primern wurde das *mdh*-Gen von diesem Fragment amplifiziert, in den Vektor pET24a(+) ligiert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und exprimiert. Zellextrakte von *E. coli* BL21(DE3)pET24a(+) *Lmdh* zeigten nach Induktion in der
10 SDS-Polyacrylelektrophorese eine starke Überexpressionsbande bei 55,2 kDa und eine spezifische Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase von 102,23 U/mg Protein, während die Kontrollen (Zellen ohne Plasmid, Zellen mit leerem Plasmid) keine Aktivität zeigten.

15

Die Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des *mdh* Gens aus *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291 ist in Sequenz ID No. 1 bzw. Nr. 2 gezeigt.

20

II) Biotransformation von D-Fructose zu D-Mannitol mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm

In einem rekombinanten *E. coli*-Stamm wurden die Enzyme
25 Formiat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.2) und Mannitol-2-Dehydrogenase (EC 1.1.1.67) überexprimiert, um in den Zellen einen Oxidations-Reduktionszyklus zu etablieren. In diesem Oxidations-Reduktionszyklus wird Wasserstoff von Formiat über zelluläres NAD⁺ auf D-Fructose übertragen, wobei D-Fructose zu D-Mannitol reduziert wird
30 (s. Fig. 1).

(a) Stämme und Vektoren

Es wurden die Stämme E. coli BL21 (DE3) Gold (Stratagene) und E.coli JM109 (DE3) (Promega) verwendet. Als Vektoren wurden pET-28a(+)RspmdhNC (10) kodierend für den ORF der Mannitol-2-Dehydrogenase aus Rhodobacter sphaeroides Si4 und pBTac2FDH kodierend für die Formiat-Dehydrogenase aus Candida boidinii (35) eingesetzt.

Für die Biotransformation wurden chemisch kompetente E. coli BL21 (DE 3) Gold mit pET28a(+)RspmdhNC und pBTac2FDH kotransformiert und auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Carbenicillin und 30 µg/ml Kanamycin selektiert. Zum Vergleich des Expressionslevels der Enzyme wurden E. coli BL21 (DE 3) Gold desweiteren entweder mit pET--28a(+)RspmdhNC oder pBTac2FDH allein transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB-Agarplatten mit entweder 50 µg/ml Carbenicillin (pBTac2FDH) oder mit 30 µg/ml Kanamycin (pET-28a(+)RspmdhNC. LB-Agarplatten für E. coli BL21 (DE 3) Gold transformiert mit pET-28a(+)RspmdhNC enthielten zusätzlich 1% (v/v) D-Glucose zur Verminderung der Basalexpression der Mannitol-2-Dehydrogenase.

(b) Kultivierung und Expression

Zur Expression der Enzyme wurde eine einzelne Kolonie der Transformanten in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 30°C und 170 Upm Schüttlung vorkultiviert und in frisches LB-Medium mit 1% (v/v) D-Glucose und entsprechenden Antibiotika überimpft. Die Enzymexpression wurde mit 1 mM IPTG Endkonzentration induziert und die Kulturen für weitere 5 h bei 27°C gezogen. Die Zellmasse aus 2/5 des Kulturvolumens wurde

für enzymatische Bestimmungen verwendet, die Zellmasse aus 3/5 des Kulturvolumens wurde für die Biotransformation verwendet. Die Zellernte erfolgte bei 4000g für 5 min (Beckmann JA- 10).

5

(c) Biotransformation

Nach der Überexpression von Formiat-Dehydrogenase und MDH in E. coli, werden nichtwachsende Zellen in einer Biotransformation eingesetzt. Je 2,2 g induzierte Zellen von E. coli BL21 (DE 3) Gold pET-28a(+)RspmdhNC / pBTac2FDH wurden mit 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5 gewaschen und in 200 ml Reaktionslösung mit 500 mM D-Fructose und 500 mM Natriumformiat in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5 resuspendiert. Die Ansätze wurden in 300 ml-Kolben ohne Schikane bei 100 - 120 Upm und 30°C für 48 h geschüttelt. Zu den Zeitpunkten 0, 3, 13, 20, 27, 38, 45 und 48 h nach Reaktionsstart wurden 5 ml-Proben des Überstandes genommen zur Messung der Konzentrationen von Formiat, D-Fructose und D-Mannitol. Die Proben wurden bei 5000g für 15 min zentrifugiert (Heraeus 3360), der Überstand 0,2 µm-filtriert und bis zur Messung durch HPLC bei -20°C gelagert. Als Kontrolle wurden 5,5 g nichtinduzierte Zellen von E. coli BL21 (DE 3) Gold pET-28a(+)RspmdhNC/pBTac2FDH in gleicher Weise in der Biotransformation eingesetzt.

Die Konzentrationbestimmungen von Formiat, D-Fructose und D-Mannitol im Reaktionsüberstand und im zellfreien Rohextrakt wurden mit einer HPLC-Anlage (Merck/Hitachi) durchgeführt.

Tabelle 1 zeigt beispielhaft Ergebnisse, die mit transformierten Mikroorganismen erreicht werden konnten.

Tabelle 1: Produktion von D-Mannitol und Verbrauch von D-Fructose und Natriumformiat während einer Biotrans-

5 formation

	Substanz- produktion/- verbrauch (g/g Nass- zellmasse)	E.coli BL21 (DE3) pET- 28a(+) RspmdhNC pBTac2FDH Induziert Ansatz 1	E.coli BL21 (DE3) pET- 28a(+) RspmdhNC pBTac2FDH Induziert Ansatz 2	E.coli BL21 (DE3) pET- 28a(+) RspmdhNC pBTac2FDH nicht indu- ziert Kontrolle
13 h nach Reak- tions- start	D-Mannitol Produktion	0,36	0,28	0,02
	D-Fructose Verbrauch	0,97	0,91	0,01
	Formiat-Ver- brauch	0,33	0,22	0,04
48 h nach Reak- tions- start	D-Mannitol Produktion	0,42	0,37	0,05
	D-Fructose Verbrauch	1,32	1,0	0,47
	Formiat-Ver- brauch	0,49	0,54	0,20

Es konnte gezeigt werden, dass die parallele Überex-
pression der Formiat-Dehydrogenase und der Manni-
tol-2-Dehydrogenase in E. coli zu einer Produktion von
10 D-Mannitol durch diese Zellen in einem Reaktionsmedium
mit D-Fructose und Formiat führt.

(d) Enzymatische Bestimmungen

Enzymatische Aktivitäten der Formiat-Dehydrogenase und
15 MDH im zellfreien Extrakt wurden photometrisch bei

340 nm gemessen. Der Testansatz für die Formiat-Dehydrogenase enthielt 2 mM NAD⁺ und 200 mM Natriumformiat in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer mit pH 6,5. Diese hohen Coenzym- und Substratkonzentrationen waren
5 aufgrund der hohen K_m -Werte der Formiat-Dehydrogenase zum Erreichen der Maximalgeschwindigkeit notwendig (35). Der pH-Wert entsprach den Bedingungen der Bio-
transformation. Der Ansatz zur Messung der Aktivität der MDH war wie unter Ic) beschrieben. Beide Bestimmun-
10 gen wurden bei 30°C durchgeführt. Nach 2 min Messung der Basalaktivität ohne Substrat wurde die enzymspezifische Aktivität nach Zugabe des Substrats für weitere 2 min gemessen. Zur Berechnung der Aktivität wurde der
spezifische Absorptions-Koeffizient von NAD bei 340 nm
15 $E = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, verwendet. Eine Unit wurde definiert als die Reduktion oder Oxidation von 1 μmol NAD pro min bei pH 6,5 und 30°C.

Die spezifische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase im zellfreien Rohextrakt von E. coli BL21 (DE 3) Gold pET-
20 28a(+)RspmdhNC / pBTac2FDH lag bei 0,14 U/mg. Slusarczyk et al. maßen für die spezifische Aktivität der gereinigten Formiat-Dehydrogenase 6,5 U/mg (35). Unter Verwendung dieses Wertes berechnet sich der Anteil der
Formiat-Dehydrogenase am löslichen Zellprotein im indu-
25 zierten E. coli BL21 (DE 3) Gold pET-28a(+)RspmdhNC / pBTac2FDH auf 2,2%.

Hinsichtlich der Stabilität der MDH konnte auch 48 h nach Reaktionsstart keine Verminderung der spezifischen
30 Aktivität im zellfreien Rohextrakt festgestellt werden (Tabelle 2).

Die spezifische Aktivität der MDH im zellfreien Rohextrakt erwies sich mit 10 - 12 U/mg als konstant hoch. Die parallele Expression der Formiat-Dehydrogenase in *E. coli* BL21 (DE 3) Gold pET28a(+)RspmdhNC / pBTac2FDH

5 erbrachte keine Minderung der spezifischen Aktivität der MDH im zellfreien Rohextrakt.

Tabelle 2: Spezifische Enzymaktivitäten der MDH und der Formiat Dehydrogenase

	E.coli BL21 (DE3) pET- 28a(+)RspmdhNC pBTac2FDH induziert Ansatz 1	E.coli BL21 (DE3) pET- 28a(+)RspmdhNC pBTac2FDH induziert Ansatz 2	E.coli BL21 (DE3) pET- 28a(+)RspmdhNC pBTac2FDH nicht indu- ziert Kontrolle
MDH (U/mg) nach Induktion	12,08	11,07	0,13
FDH (U/mg) nach Induktion	0,14	0,14	0,04
MDH (U/mg) 48 h nach Re- aktionsstart	14,97	16,46	0,17
FDH (U/mg) 48 h nach Re- aktionsstart	0	0	0

- 10 Die oben gezeigte Biotransformation von D-Fructose zu D-Mannitol mit einer Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Rhodobacter spaeroides* kann in vergleichbarer Weise auch für die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* durchgeführt werden. Die erfindungsge-
- 15 mäßige Nukleotidsequenz kann mit für den Fachmann bekannten Methoden in den entsprechenden Wirtsorganismus z. B. *E. coli* transformiert und exprimiert werden und dieser dann zur mikrobiellen Herstellung von D-Mannitol eingesetzt werden.

Literatur

1. American Society for Bacteriology: Manual of Methods for General Bacteriology", Washington D.C.,
5 USA, (1981)
2. Bhosale, S.H., Rao M.B., Deshpande V.V. (1996) Microbiol. Rev. 60: 280-300
3. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive
10 method for the quantitation of microgram amounts of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254)
4. Brünker P, Altenbuchner J, Mattes R (1998) Structure and function of the genes involved in
mannitol, arabitol and glucitol utilization from
15 *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106. Gene 206: 117-126.
5. Chmiel: Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, (1991)
- 20 6. Dubbendorff JW, Studier FW (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. J Mol Biol. 219: 45-59.)
7. Eikmanns et al. (1991) Gene 102, 93-98
- 25 8. Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994)
9. Guerrero et al. (1994) Gene 138, 35-41
- 30 10. Hahn G. (2000) Entwicklung eines mikrobiellen Verfahrens zur Herstellung von D-Mannitol, Diplomarbeit, Universität Düsseldorf

11. Horer S, Stoop J, Mooibroeck H, Baumann U, Sassoon
J (2001) The chrystallographic structure of
mannitol-2-dehydrogenase NADP⁺ binary complex from
Agaricus bisporus. *J. Biol. Chem.* 276: 27555 -
5 27561.
12. Horikoshi K. (1963) Meth. Enzym. Analysis, 3rd ed.
Vol.6. H. U. Bergmeyer, Hrsg., Verlag Chemie, Wein-
heim,
13. Jensen und Hammer (1998) Biotechnology and Bioen-
10 gineering 58, 191-195
14. Kazusa Research Institute, Chiba, Japan: Codon
Usage Database
15. Keilhauer, C. et al (1993) *J. Bacteriol.*,
175:5593-5603
- 15 16. LaBarre et al. (1993) *Journal of Bacteriology* 175,
1001-1007
17. Lämmli U. K. (1970) Cleavage of structural pro-
teins during assembly of the head of bacteriophage
T4. *Nature* 19: 680-685.
- 20 18. Liebl et al. (*International Journal of Systematic
Bacteriology* (1991) 41: 255-260).
19. Lindroth et al. (1979) *Analytical Chemistry* 51:
1167-1174)
20. Lottspeich, F. und Zorbas, H., Hrsg., (1998) Bio-
25 analytik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Hei-
delberg, Berlin).
21. Makkee M, Kieboom APG, Van Bekkum H (1985), Pro-
duction methods of D-mannitol. *Starch/Stärke* 37:
136-140.
- 30 22. Makrides (1996) *Microbiological Reviews* 60:512-538
23. Malumbres et al. (1993) *Gene* 134, 15 - 24
24. Maniatis, T.; Fritsch E. F.; und Sambrook J. Mo-
lecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring

Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
(1989)

25. Martin et al. (1987) Bio/Technology 5, 137-146
26. Morton N, Dickerson AG, Hammond JBW (1985)
- 5 Mannitol metabolism in *Agaricus bisporus*:
purification and properties of mannitol
dehydrogenase. J. Gen. Microbiol. 131: 2885 -
2890).
27. Reinscheid et al. (1994) Applied and Environmental
10 Microbiology 60, 126-132
28. Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) "The DIG
System Users Guide for Filter Hybridization"
29. Rosenberg AH, Lade BN, Chul D, Lin S, Dunn JJ,
Studier FW (1987) Vectors for selective expresion
15 of cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. Gene 56:
125-135.
30. Sakai S, Yamanaka K (1968) Crystalline D-
mannitol:NAD oxidoreductase from *Leuconostoc pseu-*
domesenteroides. Agric. Biol. Chem. 32:894-898.
- 20 31. Sakai S, Yamanaka K. (1968) Cristalline D-
mannitol:NAD⁺ oxidoreductase from *Leuconostoc*
pseudomesenteroides. Biochem. Biophys. Acta
151:684-686
32. Schneider KH, Giffhorn F, Kaplan S (1993) Cloning,
25 nucleotide sequence and characterization of the
mannitol dehydrogenase gene from *Rhodobacter*
sphaeroides. J. Gen. Microbiology 139: 2475-2484
33. Schwarzer und Pühler (1991) Bio/Technology 9,
84-87
- 30 34. Slatner M, Nidetzky B, Kulbe KD (1999) Kinetic
studies of catalytic mechanism of mannitol
dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*.
Biochemistry 38: 10489-10498

35. Slusaczyk, H.; Felber, S.; Kula, M. R.; Pohl, M.
Stabilization of NAD-dependent formate dehydroge-
nase from *Candida boidinii* by site-directed mutag-
nesis of cystein residues. *Eur. J. Biochem.* 267:
5 1280-1289
36. Soetaert (1991) Synthesis of D-mannitol and L-
sorbitose by microbial hydrogenation and dehydroge-
nation of monosaccharides. PhD Thesis, University
of Gent)
- 10 37. Soetaert W, Buchholz K, Vandamme EJ (1995), Pro-
duction of D-mannitol and D-lactic acid by ferment-
ation with *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Agro-
Food-Industry Hi-Tech* 6(1): 41-44.)
38. Stoop JM, Mooibroeck H (1998) Cloning and
15 characterization of NADP-mannitol dehydrogenase
cDNA from the button mushroom *Agaricus bisporus*,
and its expression in response to NaCl stress.
Appl. Environ. Microbiol. 64: 4689 - 4696.
39. Storhas: Bioreaktoren und periphere Einrichtungen,
20 Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, (1994))
40. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubbendorff JW
(1990) Use of T7 RNA Polymerase to direct expres-
sion of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 45-59.
41. Tsuchiya und Morinaga (1988) *BioTechnology* 6,
25 428-430
42. Wisniak J, Simon R (1979) Hydrogenation of glu-
cose, fructose and their mixture. *Ind. Eng. Chem.
Prod. Res. Dev.* 18: 50-57.
43. Wright LW (1974) Sorbitol and mannitol. *Chemtech*
30 Jan 1974: 42-46.).
44. Yamanaka K (1975) D-mannitol dehydrogenase from
Leuconostoc pseudomesenteroides. *Meth. Enzymol.*
41:138-142

45. Yamanaka K, Izawa K, Tenmizu K (1977) Physicochemical properties of cristalline D-mannitol dehydrogenase of *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Agric. Biol. Chem. 41:1695-1699
- 5 46. Seelbach, K., Riebel, B., Hummel, W., Kula, M.-R., Tishkov, V., Egorov, A., Wandrey, C. and Kragl, U. (1996) A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase Tetrahedron Lett. 37, 1377-1380
- 10 47. Slatner, M. et al. (1998) Biotransf. 16: 351-363

P a t e n t a n s p r ü c h e

-
1. Nukleotidsequenz kodierend für eine MDH, enthaltend
- (i) eine Nukleotidsequenz gezeigt in SEQ ID No. 1
- 5 (ii) mindestens eine Nukleotidsequenz, die der Nukleotidsequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- 10 (iii) mindestens eine Nukleotidsequenz, die mit der zur Nukleotidsequenz (i) oder (ii) komplementären Nukleotidsequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iiii) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
2. Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 1,
- 15 dadurch gekennzeichnet, dass sie aus der Familie der Lactobacteriaceae isoliert wird.
3. Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2,
- 20 dadurch gekennzeichnet, dass sie aus *Leuconostoc pseudomensenteroides* isoliert wird.
4. Plasmid pQE80Lmdh,
- hinterlegt bei der DSMZ unter der Bezeichnung DSM 14824.
- 25 5. Genstruktur enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen.

6. Vektor, enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 oder eine Genstruktur gemäß Anspruch 5 sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion, zur Replikation in der Wirtszelle oder zur Integration in das Wirtszell-Genom.
7. Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, kodierend für eine MDH gekennzeichnet dadurch, dass sie ausgehend von einer Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält.
8. MDH oder ein Teil davon, kodiert durch eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
9. MDH mit einer Aminosäuresequenz abgeleitet aus der Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, dargestellt in der Seq-ID-NO. 2 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon oder Mischungen daraus.
10. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 8 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der Familie der Lactobacteriaceae stammt.
11. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 8 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass es aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* stammt.
12. Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, welcher im Vergleich zum entsprechend nicht

genetisch veränderten Mikroorganismus verstärkt ist und/oder dessen Kopienzahl erhöht ist.

13. Mikroorganismus gemäß Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet, dass
5 er eine Genstruktur gemäß Anspruch 5 oder einen Vektor gemäß Anspruch 6 oder ein Plasmid gemäß Anspruch 4 enthält.
14. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13, enthaltend wenigstens ein Polypeptid gemäß
10 einem der Ansprüche 8 bis 11, welcher eine im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöhte Aktivität aufweist.
15. Mikroorganismus gemäß Anspruch 12 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, dass
15 er aus der Gattung *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, den *Enterobacteriaceae* oder methylo- trophen Hefen, Pilzen sowie aus allen auch in der Lebensmittelindustrie verwendeten Mikroorganismen stammt.
16. Mikroorganismus gemäß Anspruch 12 bis 15,
20 dadurch gekennzeichnet, dass er aus der Gruppe *Achromobacter parvolus*, *Methylobacterium organophilum*, *Mycobacterium formicum*, *Pseudomonas spec. 101*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Moraxella sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Paracoccus sp.*, *An-*
25 *cylobacter aquaticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Gluconobacter oxydans*, *Candida boidinii*, *Candida methylica* oder auch *Hansenula po-*

lymorpha, Aspergillus nidulans oder Neurospora crassa oder Escherichia coli stammt.

17. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von D-Mannitol,
5 dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen man die für die MDH codierende Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 1 bis 3 einbringt und/oder verstärkt.
18. Verfahren nach Anspruch 17,
10 dadurch gekennzeichnet, dass man einen mit einem oder mehreren Plasmidvektoren transformierten Mikroorganismus einsetzt, der einen Plasmidvektor für die MDH codierende Nukleotidsequenz trägt.
- 15 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass mit dem Plasmidvektor pQE80Lmdh, hinterlegt unter der Nummer DSM 14824, transformierte Mikroorganismen eingesetzt werden.
- 20 20. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von D-Mannitol,
dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in die eine für eine MDH sowie eine für eine Formiat-Dehydrogenase co-
25 dierende Nukleotidsequenz eingebracht und/oder verstärkt wird.
21. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in die eine für die

MDH codierende Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 1 bis 3 eingebracht und/oder verstärkt wird.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass
- 5 man Mikroorganismen einsetzt, in denen man eine für eine Formiat-Dehydrogenase codierende Nukleotidsequenz isoliert aus *Candida boidinii* einbringt und/oder verstärkt.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22,
- 10 dadurch gekennzeichnet, dass man einen mit einem oder mehreren Plasmidvektoren transformierten Mikroorganismus einsetzt, der einen Plasmidvektor für die MDH sowie für die Formiat-Dehydrogenase codierende Nukleotidsequenz trägt.
- 15 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen der Gattung *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, den Enterobakteriaceae oder methylo-trophen Hefen, Pilze sowie Mikroorganismen,
- 20 die in der Lebensmittelindustrie verwendeten werden, einsetzt.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass Mikroorganismen aus der Gruppe *Achromobacter parvus*,
- 25 *Methylobacterium organophilum*, *Mycobacterium formicum*, *Pseudomonas spec. 101*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Moraxella sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Paracoccus sp.*, *Ancylobacter aquaticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*,
- 30 *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus brevis*, *Leu-*

conostoc pseudomesenteroides, Gluconobacter oxydans, Candida boidinii, Candida methylica oder auch Hansenula polymorpha, Aspergillus nidulans oder Neurospora crassa oder Escherichia coli eingesetzt werden.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass als Kohlenstoffquelle Fructose oder Glucose eingesetzt wird.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:
- a) Mikrobielle Herstellung von D-Mannitol unter Verwendung von Mikroorganismen, in die die für eine MDH kodierende Nucleotidsequenz sowie eine für eine Formiat-Dehydrogenase kodierende Nucleotidsequenz eingebracht und/oder verstärkt wird
 - b) Anreicherung des D-Mannitol im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen und
 - c) Isolieren des D-Mannitol.
28. Verfahren nach Anspruche 27, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen verwendet, in die die für die MDH kodierende Nucleotidsequenz gemäß Anspruch 1 bis 3 eingebracht und/oder verstärkt wird.

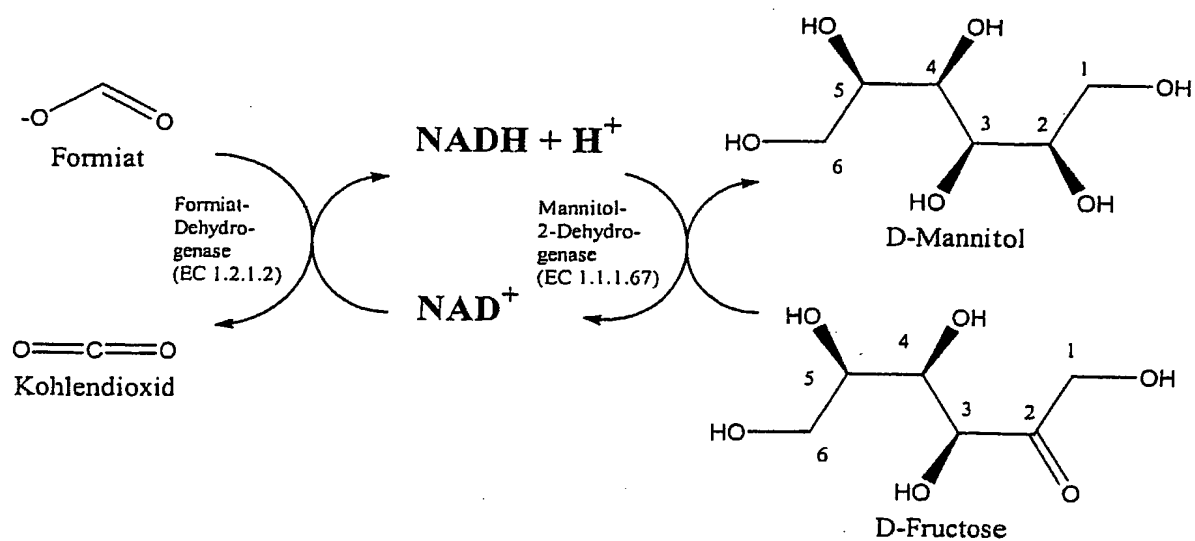


Fig. 1

Aminosäuresequenz

M E A L V L T G

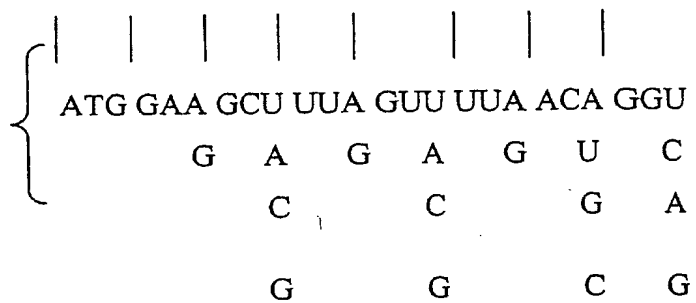
Degenerierte
Oligonucleotid-
sequenz

Fig. 2

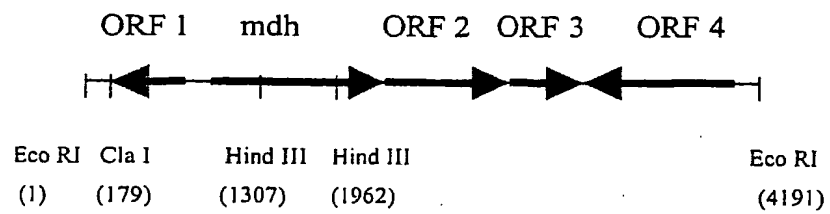


Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH- Zuckerinstitut e.V.

<120> Mannitol-2-Dehydrogenase

<130> PT 1.1978

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1370

<212> DNA

<213> Leuconostoc pseudomesenteroides

<220>

<221> RBS

<222> (185) .. (190)

<400> 1

```
tactgaaaca ccagccaacg ccgcgacatc acttaatttt gctaccattg caatcctcca 60
tactctctta atattctatc acatgggtcta ctccccttac taaaataaat gtgataaacg 120
tttgacttta tcttggttaa gggtttaccat tgcctcgtta agttaattta atcacaaagt 180
aaaaaggaga acaaacatgg aagcacttgt gttaactggg acaaaaaaat tagagggtga 240
aaacattgaa caacctgagg taaagccgaa tgaagtgttg attcatacag cattcgctgg 300
tatttgcggt actgatcacg ctttgtatgc cggctcttct ggctcagccg atgctgtgcc 360
accaatcggt ttggggcatg aaaattcttg tgttgtagct gaaattgggt ctgatgttac 420
aaacgttgcg gtgggtgatc gtgtcacaat tgatcccaat atttactgtg gtcaatgcaa 480
gtattgccgt acagcacgtc cagagctttg cgaaaacttg tctgcagttg gtgtaaacag 540
caatgggtggc tttgaagaat actttactgc gcccgcatca gttgtttacc aaattccaga 600
taatgtttca cttaagtcag ctgccgtggg tgagccgatt tcatgtgctg ttcacgggat 660
tcaacttctt aaagtgcac cataccaaaa ggcattagtt attgggtgac gtttcatggg 720
tgaactcttt gttcaaattc tgcaagctta tggcattcac caagtcgact tggctgggat 780
tgttcctgaa aagcttgcta tgaacaaaga aaagttcggc gtgaaaaata cgtacaatac 840
aaaagatggc gacaaaattc ccgaaggcac ttacgatgtt gttgttgaag cagttggcct 900
accacagaca caagaagccg caattgaagc ctcagctcgt ggcgctcagg ttttgatgtt 960
tggtggtggc ggtcccagcg caaagttcca aatgaacact tacgaagtct tccaaaagca 1020
attgacgatt caaggatcat ttatcaatcc aaacgcattt gaagactcat tggcattgtt 1080
atcatcaggc aagttagacg tcgaatcgct aatgtcacac gaattagatt accagactgt 1140
tgatgacttt gtgaatggca agttaggtgt cgtttcaaag gcagtcgtta aggttgggtg 1200
cgaagaggca taaaatggca caaacgcgc aacatcataa tccgcgaagc atttcaatga 1260
gcaaatcact tatgtttttt gccatctcat tgatttttaa tgcgatggga aatgttttga 1320
cgctcgtcac agcttcacat ataaaacccg cttttttggg atcagcttat 1370
```

<210> 2

<211> 338

<212> PRT

<213> *Leuconostoc pseudomesenteroides*

<400> 2

Met Glu Ala Leu Val Leu Thr Gly Thr Lys Lys Leu Glu Val Glu Asn
 1 5 10 15

Ile Glu Gln Pro Glu Val Lys Pro Asn Glu Val Leu Ile His Thr Ala
 20 25 30

Phe Ala Gly Ile Cys Gly Thr Asp His Ala Leu Tyr Ala Gly Leu Pro
 35 40 45

Gly Ser Ala Asp Ala Val Pro Pro Ile Val Leu Gly His Glu Asn Ser
 50 55 60

Gly Val Val Ala Glu Ile Gly Ser Asp Val Thr Asn Val Ala Val Gly
 65 70 75 80

Asp Arg Val Thr Ile Asp Pro Asn Ile Tyr Cys Gly Gln Cys Lys Tyr
 85 90 95

Cys Arg Thr Ala Arg Pro Glu Leu Cys Glu Asn Leu Ser Ala Val Gly
 100 105 110

Val Thr Arg Asn Gly Gly Phe Glu Glu Tyr Phe Thr Ala Pro Ala Ser
 115 120 125

Val Val Tyr Gln Ile Pro Asp Asn Val Ser Leu Lys Ser Ala Ala Val
 130 135 140

Val Glu Pro Ile Ser Cys Ala Val His Gly Ile Gln Leu Leu Lys Val
 145 150 155 160

Thr Pro Tyr Gln Lys Ala Leu Val Ile Gly Asp Gly Phe Met Gly Glu
 165 170 175

Leu Phe Val Gln Ile Leu Gln Ala Tyr Gly Ile His Gln Val Asp Leu
 180 185 190

Ala Gly Ile Val Pro Glu Lys Leu Ala Met Asn Lys Glu Lys Phe Gly
 195 200 205

Val Lys Asn Thr Tyr Asn Thr Lys Asp Gly Asp Lys Ile Pro Glu Gly

210 215 220

Thr Tyr Asp Val Val Val Glu Ala Val Gly Leu Pro Gln Thr Gln Glu
225 230 235 240

Ala Ala Ile Glu Ala Ser Ala Arg Gly Ala Gln Val Leu Met Phe Gly
245 250 255

Val Gly Gly Pro Asp Ala Lys Phe Gln Met Asn Thr Tyr Glu Val Phe
260 265 270

Gln Lys Gln Leu Thr Ile Gln Gly Ser Phe Ile Asn Pro Asn Ala Phe
275 280 285

Glu Asp Ser Leu Ala Leu Leu Ser Ser Gly Lys Leu Asp Val Glu Ser
290 295 300

Leu Met Ser His Glu Leu Asp Tyr Gln Thr Val Asp Asp Phe Val Asn
305 310 315 320

Gly Lys Leu Gly Val Val Ser Lys Ala Val Val Lys Val Gly Gly Glu
325 330 335

Glu Ala

REC'D 22 JUL 2003


INTERNATIONALES FORMBLATT

WIPO PCT

Forschungszentrum Jülich

52425 Jülich

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: pQE80Lmdh	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14824
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde (X) eine wissenschaftliche Beschreibung () eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2002-02-19 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2002-02-20


¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Forschungszentrum Jülich

52425 Jülich

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Forschungszentrum Jülich Anschrift: 52425 Jülich	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14824 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 2002-02-19
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2002-02-19 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input type="checkbox"/> ¹ lebensfähig <input type="checkbox"/> ¹ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ¹	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2002-02-20

- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.